



DEUTSCHES
PATENTAMT

21 Aktenzeichen: 196 41 210.2
22 Anmeldetag: 25. 9. 96
43 Offenlegungstag: 2. 4. 98

DE 196 41 210 A 1

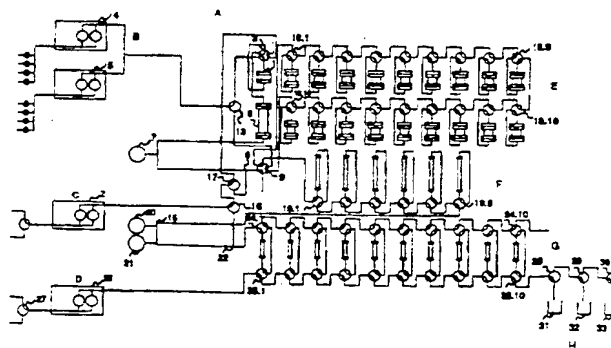
71 Anmelder:
AnalytiCon AG Biotechnologie Pharmazie, 13355
Berlin, DE
74 Vertreter:
Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10785
Berlin

72 Erfinder:
Gumm, Holger, 13503 Berlin, DE; Müller-Kuhrt, Lutz,
Dr., 14089 Berlin, DE
56 Entgegenhaltungen:
DE 43 12 925 A1
BEO-Jahresbericht 1994 des Bundesministeriums f.
Bildg., Wiss., Forschung u. Technol., S.413-414;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Vorrichtung und Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer Substanzgemische

57 Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung und ein Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer Substanzgemische. Pflanzliche und mikrobielle Extrakte sind hochkomplexe Substanzgemische. Sie enthalten in großer Zahl sowohl extrem polare als auch unpolare Stoffe. Die Auftrennung dieser Gemische ist prinzipiell mit chromatischen Verfahren möglich. Allerdings ist der zeitliche Aufwand der Trennung mit den bisher bekannten chromatographischen Vorrichtungen, z. B. HPLC-Anlagen, unverträglich hoch. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine HPLC-Anlage anzubieten, die vollautomatisch in kürzester Zeit hochkomplexe Substanzgemische soweit auftrennt, daß ihre Bestandteile nahezu rein vorliegen, die dann einem Testsystem zugeführt werden können. Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit einer Vorrichtung auf HPLC-Basis, die Trennsäuleneinheiten (A, F), Fraktioniersäuleneinheiten (E, G), Detektoreinheiten (7 und 20, 21), Pumpeneinheiten (B, C, D), Fraktionssammelereinheiten umfaßt, wobei diese Einheiten einschließlich jeder einzelnen Trenn- bzw. Fraktioniersäule über Mehr-Wege-Ventile ansteuerbar miteinander verbunden sind, sowie eine Rechneinheit für das softwaregesteuerte funktionelle Zusammenwirken der Vorrichtung.



DE 196 41 210 A 1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung und ein Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer Substanzgemische.

Mehr als ein Drittel der zur Zeit am Markt befindlichen Arzneimittel enthalten Wirkstoffe, die die Natur zur Verfügung gestellt hat, d. h. sie wurden aus Pflanzen oder Mikroorganismen isoliert, oder aber zumindest auf dieser Basis modifiziert.

Trotz dieser relativ hohen Anzahl an biologisch aktiven Substanzen, die die Natur zur Verfügung hat, hat man sich weltweit bisher mehr auf die chemische Synthese als auf den sogenannten Naturstoffpool konzentriert. In den letzten Jahren wurden jedoch neue Wirkstoffe entdeckt, die von der Natur geschaffen wurden, und dadurch erlebt die Naturstoffchemie bzw. Naturstoffbiotechnologie eine Renaissance.

Gleichzeitig mit der Entdeckung bzw. Herstellung neuer Wirkstoffe erfolgte eine schnelle Entwicklung auf dem Sektor der Testsystemkapazitäten. Während derartige biologische Assays zur Auffindung neuer potentieller Wirkstoffe noch vor Jahren einige 100 mg Substanz erforderlich waren und damit häufig lediglich nur geringe Durchsätze von Tests pro Jahr möglich waren, stellt sich die Situation gegenwärtig grundlegend anders dar. Infolge von Testdesigns, die z. B. die Hemmung eines spezifischen Enzyms als Maß für die biologische Aktivität annehmen, lassen sich miniaturisierte Testautomaten realisieren, mit denen sich durchaus eine Million Substanzen pro Jahr bei gleichzeitig niedrigstem Substanzverbrauch untersuchen lassen. Das Vorhandensein dieser enormen Testsystemkapazitäten kommt der Naturstoffforschung entgegen, denn von den aus Pflanzen oder mikrobiellen Fermentationen isolierten reinen Naturstoffen stehen häufig nur wenige Milligramm zur Verfügung, solange eine besondere biologische Aktivität noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Obwohl bereits eine große Zahl von Naturstoffen bekannt sind, muß man davon ausgehen, daß die Natur noch eine viel größere Anzahl von Substanzen bereithält, die bisher unbekannt sind, so daß man an einem Hochdurchsatzscreening von einer großen Zahl pflanzlicher und mikrobieller Rohextrakte nicht vorbeikommt.

Die Prüfung natürlicher Extrakte erfordern allerdings eine langwierige Prozedur der Vorreinigung, Vortrennung, Zwischen- und Feinreinigung, die immer wieder unterbrochen werden müssen durch Testung auf biologische Aktivität. Diese Vorgehensweise erfordert einen hohen zeitlichen, personellen sowie logistischen Aufwand und führt darüberhinaus vielfach zu nicht weiter verfolgungswerten chemischen Substanzen.

In Anbetracht des Kostendruckes der aus dem Gesundheitswesen in die forschenden Einrichtungen hineingetragen wird, führen derartige Zeitverluste zu einer immer stärkeren Benachteiligung der auf der Naturstoffforschung basierenden Forschung und Entwicklung. Pflanzliche und mikrobielle Extrakte sind hochkomplexe Substanzgemische. Sie enthalten in großer Zahl sowohl extrem polare als auch unpolare Stoffe. Die Auftrennung dieser Gemische ist prinzipiell mit chromatischen Verfahren möglich. Allerdings ist der zeitliche Aufwand der Trennung mit den bisher bekannten chromatographischen Vorrichtung, z. B. HPLC-Anlagen, unvermeidbar hoch.

Im BEO-Jahresbericht 94 des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Seiten 413 und 414, ist eine HPLC-Anlage zur Naturstoff-

solierung beschrieben, die pflanzliche und mikrobielle Extrakte grob- und feinfractionieren soll.

Die Anlage weist folgende Nachteile auf:

- Die Zuschaltung hier genannter Fraktionssammelsäulen erfolgt über 12-Wege-Ventile, deren Einsatz bei präparativen Anwendungen sehr kostenaufwendig ist. Die hier erforderliche Häufigkeit der Schaltungen führt zu einem schnelleren Verschleiß von Bauteilen und Dichtungen.
- Ein variabler Einsatz entsprechend der zu trennenden Gemische durch Erweiterungen oder auch Verringerung der Anzahl der Säulen ist nicht möglich, d. h., ein modularer Aufbau der Anlage ist aufgrund dieser Konstruktion nicht durchführbar.
- Die große Anzahl von Fraktionssammelsäulen führt zu einer zu langen Laufzeit und zu einem hohen Lösungsmittelverbrauch.
- Ein kostengünstiger und zeitsparender Roll-over-Betrieb ist nicht durchführbar.
- Die hier vorgesehene isokratische Trennung im zweiten Trennschritt führt ebenfalls zu einer nachteiligen Verlängerung der Laufzeit.

Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde eine HPLC-Anlage anzubieten, die vollautomatisch in kürzester Zeit hochkomplexe Substanzgemische soweit auftrennt, daß seine Bestandteile nahezu rein vorliegen, die dann einem Testsystem zugeführt werden können.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit einer Vorrichtung und einem Verfahren auf HPLC-Basis gemäß der Ansprüche 1 und 22.

Die erfindungsgemäß zugrunde gelegte Technologie der Auftrennung der Extrakte ist die Hochdruckflüssig-Chromatographie, die in der Lage ist, sowohl relativ polare als auch unpolare Verbindungen zu trennen. Aufgrund der hohen Anzahl von Substanzen in einem komplexen Substanzgemisch wie z. B. in pflanzlichen und mikrobiellen Extrakten, ist die Trennung in einem Schritt nicht möglich. Es ist vielmehr die erfindungsgemäße Kombination mehrerer Trennsäulensysteme erforderlich, um in vertretbarer Zeit eine Auftrennung zu erreichen.

Die Erfindung weist verschiedene Vorteile auf. So ermöglicht die Erfindung in einer Anlage eine Grob- und eine Feintrennung vorzunehmen und zwischenzeitlich abgetrennte Fraktionen abrufbereit auf festen Phasen zu speichern, so daß innerhalb kürzester Zeit mittels der softwaregesteuerten Vorrichtung eine praktisch vollständige Auftrennung aller Substanzfraktionen erreicht werden kann. Dadurch ist es denkbar, daß bei günstiger Infrastruktur, also das Vorhandensein entsprechender Testsysteme verbunden mit einer Strukturauflösung innerhalb von 2 bis 3 Tagen eine Identifizierung der wirksamen Komponente eines Extraktes zu ermöglichen. Das bedeutet eine extreme Beschleunigung des Wirkstofffindungsprozesses, der ausgehend von Naturstoffgemischen wie pflanzliche oder mikrobielle Extrakte üblicherweise Monate dauert. Vorteilhafterweise weist die erfindungsgemäße Vorrichtung einen modularen Aufbau auf, der Erweiterungen in Abhängigkeit von der Komplexität zu trennender Substanzgemische ermöglicht.

Die Erfindung wird anhand einer Zeichnung näher erläutert. Es zeigt

Fig. 1 den Aufbau und Ablaufschema der Vorrichtung.

Das zu trennende Multikomponent-Gemisch (z. B.

Pflanzenextrakt, mikrobieller Extrakt usw.) wird in Methanol gelöst und mit RP-4-Material (Korngröße ca. 40 µm) in folgendem Verhältnis 1 Massenteil Extrakt zu 3 Massenteilen RP-4-Material versetzt. Von diesem Gemisch wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, so daß eine rieselfähige Mischung aus Extrakt und RP-Material entsteht. Die Mischung wird in eine Aufgabesäule 1 trocken verfüllt und in die Trennsäuleneinheit A eingebaut.

Mit einer Pumpe 2 und als Eluent Wasser wird über die 3-Wege-Ventile 16, 17 und über ein 6-Wege-Ventil 3 die Luft aus der trockenverfüllten Aufgabesäule 1 entfernt. Wenn die Luft entfernt ist, wird das Trennprogramm gestartet. Das Trennprogramm wird über eine Software gesteuert.

Mit einer Pumpe 4 und einer Pumpe 5 der Pumpeinheit B wird ein Gradient von 0% bis 100% des mit der Pumpe 5 geförderten Laufmittels bzw. Elemente mit einer Laufzeit von 60 min gefahren, wobei es sich bei Pumpe 4 um eine wäßrige Puffer-Lösung und bei Pumpe 5 um Methanol handelt. Die Komponenten des Extraktes werden in Abhängigkeit ihrer Polarität von der Aufgabesäule 1 über das 6-Wege-Ventil 3 auf die Trennsäule 6 gespült. Die Trennsäule 6 ist mit RP-4-Material gefüllt. In einem UV-Detektor 7 werden die Komponenten detektiert und mit der Software aufgezeichnet. Die Komponenten gelangen zu einem T-Stück 8, wo über die Pumpe 2 und die 3-Wege-Ventile 16, 17 Wasser zum Eluent dosiert und dadurch die Polarität der Lösung erhöht wird. Danach gelangt dieses Eluat über ein 6-Wege-Ventil 9 zu einer Fraktionssäuleneinheit E, die aus 18 Fraktionssäulen besteht.

Die Fraktionssäulen der Fraktionssäuleneinheit E sind mit verschiedenen Sorbentien gefüllt, an denen durch Festphasenextraktion die Komponenten extrahiert werden.

Jede Fraktionssäule wird für einen Zeitraum von 3—4 min geschaltet. Die Fraktionssäulen werden über jeweilige 4-Wege-Ventile 18.1 bis 18.18 in den Eluentenstrom geschaltet. Dadurch wird der 60-minutige Gradient in 18 Fraktionen aufgeteilt. Das komponentenfreie Eluat gelangt über das 6-Wege-Ventil 9 in den Abfall.

Jede einzelne der auf den 18 Fraktionssäulen gespeicherten Fraktionen wird über eine der sechs Trennsäulen einer Trennsäuleneinheit F weiter aufgetrennt. Dabei wird über die Pumpe 4 und Pumpe 5 der Pumpeinheit B, über das 3-Wege-Ventil 13, das 6-Wege-Ventil 9 und über das entsprechende 4-Wege-Ventil 18.1 bis 18.18 die Komponenten rückwärts von einer der Fraktionssäulen auf eine der sechs Trennsäulen der Trennsäuleneinheit F gespült und die Komponenten weiter aufgetrennt. Die sechs Trennsäulen werden über entsprechende 4-Wege-Ventile 19.1 bis 19.6 geschaltet.

Die getrennten Komponenten gelangen nach der Trennsäuleneinheit F in ein Split-Ventil 15, wo ein Teil (ca. 1/40) des Volumenstromes einem Lichtstreuendetektor 20 zugeführt wird. Der restliche Volumenstrom gelangt über einen weiteren UV-Detektor zu einem T-Stück 22, wo über die Pumpe 2 und ein 3-Wege-Ventil 16 Wasser zum Eluat dosiert und dadurch die Polarität der Lösung erhöht wird. Dieses Eluat gelangt dann zu einer Fraktionssäuleneinheit G, die über zehn 4-Wege-Ventile 14.1 bis 14.10 geschaltet und mit den getrennten Komponenten beschichtet wird, dabei werden durch das Säulenmaterial die Komponenten aus dem Eluat extrahiert. Die Steuerung dieser Ventile erfolgt durch eine Kombination von Peakerkennung der Detektoren 20, 21 und durch Zeitsteuerung.

Die Ventile werden von dem Steuerungsprogramm so gesteuert, daß, wenn die erste Fraktionssäule beladen ist, mit Hilfe einer Pumpe 26 einer Pumpeinheit D über ein 3-Wege-Ventil 27 Methanol über das entsprechende 4-Wege-Ventil 25.1 auf die erste Fraktionssäule gefördert wird und die Komponenten über die 3-Wege-Ventile 28, 29, 30 in einen der Fraktionssammler 31, 32, 33 der Fraktionssammleereinheit H gespült werden.

Die freigespülte Fraktionssäule wird mit Wasser über das 3-Wege-Ventil 27 mittels Pumpe 26 und über das entsprechende 4-Wege-Ventil 25.1 für die nächste Fraktionierung konditioniert.

Dadurch können mehr als 10 Fraktionen bearbeitet werden, weil gleichzeitig auf Fraktionssäulen fraktioniert wird und auch Fraktionssäulen gespült und konditioniert und damit für eine weitere Fraktionierung vorbereitet werden.

Bezugszeichenliste

- 1 Aufgabesäule
- 2 Pumpe (C)
- 3 6-Wege-Ventil
- 4 Pumpe (B)
- 5 Pumpe (B)
- 6 Trennsäule
- 7 UV-Detektor
- 8 T-Stück
- 9 6-Wege-Ventil
- 13 3-Wege-Ventil
- 15 Splitt-Ventil
- 16 3-Wege-Ventil
- 17 3-Wege-Ventil
- 18 4-Wege-Ventil (18.1—18.18)
- 19 4-Wege-Ventil (19.1—19.6)
- 20 Lichtstreuendetektor
- 21 UV-Detektor
- 22 T-Stück
- 24 4-Wege-Ventil (24.1—24.10)
- 25 4-Wege-Ventil (25.1—25.10)
- 26 Pumpe (D)
- 27 3-Wege-Ventil
- 28 3-Wege-Ventil
- 29 3-Wege-Ventil
- 30 3-Wege-Ventil
- 31 Fraktionssammler
- 32 Fraktionssammler
- 33 Fraktionssammler
- A Trennsäuleneinheit
- B Pumpeinheit
- C Pumpeinheit
- D Pumpeinheit
- E Fraktionssäuleneinheit
- F Trennsäuleneinheit
- G Fraktionssäuleneinheit
- H Fraktionssammleereinheit

Patentansprüche

1. Vorrichtung auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer Substanzgemische, umfassend
 - Trennsäuleneinheiten (A, F)
 - Fraktionssäuleneinheiten (E, G)
 - Detektoreinheiten (7 und 20, 21)
 - Pumpeinheiten (B, C, D)
 - Fraktionssammleereinheiten,
 wobei diese Einheiten einschließlich jeder einzelnen Trenn- bzw. Fraktionssäule über Mehr-We-

ge-Ventile ansteuerbar miteinander verbunden sind, und

eine Rechneinheit für das softwaregesteuerte funktionelle Zusammenwirken der Vorrichtung.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens zwei Trennsäuleneinheiten (A, F) aufweist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens zwei Fraktioniereinheiten (E, G) aufweist.

4. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Detektoreinheit (20, 21) aufweist.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens drei Pumpeinheiten (B, C, D) aufweist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennsäuleneinheiten (A, F) und Fraktioniersäuleneinheiten (E, G) alternierend angeordnet sind.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß eine Trennsäuleneinheit (A) eine in Reihe geschaltete Aufgabesäule und eine Trennsäule enthält, und die weiteren Trennsäuleneinheiten mindestens zwei Trennsäulen umfassen.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennsäuleneinheit (A) aus einer Aufgabenschleife und einer Trennsäule besteht.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Detektoreinheiten (7, 20, 21) enthalten sind, die zwischen Trennsäuleneinheiten (A, F) und Fraktioniereinheiten (E, G) angeordnet sind.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Detektoreinheit (20, 21) aus einem selektiv und einem nicht selektiv messenden Detektor aufweist.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoren UV- und Lichtstreuendetektoren sind.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen massenselektiven Detektor wie ein Massenspektrometer aufweist.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens drei Pumpeinheiten (B, C, D) enthalten sind, wobei mindestens eine Pumpeinheit (B) mindestens zwei Hochdruckgradientenpumpen aufweist.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Pumpeinheiten (B, C, D) über Mehr-Wege-Ventile mit den Fraktioniersäuleneinheiten (E, G) und den Trennsäuleneinheiten (A, F) verbunden sind.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennsäulen der Trennsäuleneinheiten (A, F) mit Reversed-Phase-Materialien (RP) gefüllt sind.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennsäulen der Trennsäuleneinheit (A, F) und die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäuleneinheiten (E, G) mit Normal- und Reversed-Phase-Materialien gefüllt sind.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennsäulen und Fraktioniersäulen mit Kieselgel, mit modifizierten

Kieselgelen wie RP-2, RP-4, RP-8, RP-18, Amino, Cyano, Phenyl, Diol, Anionenaustauscher und Kationenaustauscher und/oder mit Polymerphasen gefüllt sind.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Pumpeinheit (B), die Trennsäuleneinheit (A) und die Fraktioniersäuleneinheit (E) über ein 6-Wege-Ventil (3) ansteuerbar miteinander verbunden sind.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Fraktioniersäuleneinheit (E) und die Trennsäuleneinheit (F) über ein 6-Wege-Ventil ansteuerbar miteinander verbunden sind.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäuleneinheit (E) und die Trennsäulen der Trennsäuleneinheit (F) je ein 4-Wege-Ventil aufweisen (18.1—18.18 und 19.1—19.6).

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäuleneinheit (G) je zwei 4-Wege-Ventile (24.1—24.10 und 25.1—25.10) aufweisen.

22. Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer Substanzgemische, umfassend die folgenden Stufen

— Gradiententrennung eines hochkomplexen Substanzgemisches in einer ersten Trennsäuleneinheit (A) in eine definierte Anzahl von Fraktionen mittels einer Pumpeinheit (B)

— Erhöhung der Polarität des Eluenten durch Wasserzugabe über eine Pumpeinheit (C)

— Überführung der Fraktionen in eine erste Fraktioniersäuleneinheit (G), deren Säulenanzahl der Anzahl der getrennten Fraktionen entspricht, und Adsorption der vorher aufgetrennten Fraktionen auf je eine Fraktioniersäule durch Festphasenextraktion

— sequenzielles Überspülen der in der ersten Fraktioniersäuleneinheit (E) adsorbierten Fraktionen mit weniger polaren Eluenten in eine zweite Trennsäuleneinheit (F) und weitere Auftrennung mit schwachem Gradienten mittels der Pumpeinheit (B)

— Erhöhung der Polarität des Eluenten durch Wasserzugabe über eine Pumpeinheit (C)

— sequenzielle Überführung der weiter aufgetrennten Fraktionen entsprechend der Signale der Detektoreinheit (20, 21) in eine Fraktioniersäuleneinheit (G) und der Adsorption jeder Fraktion auf eine Fraktioniersäule durch Festphasenextraktion

— sequenzielles Überspülen der Fraktionen von der Fraktioniersäuleneinheit (G) in die Fraktionssammereinheit (H) mittels einer Pumpeinheit (D) und eines weniger polaren Eluenten und anschließend Konditionieren der freigespülten Fraktioniersäule mittels der Pumpeinheit (D),

wobei der Transport der mobilen Phase und die zwischenzeitlich erforderlichen Konditionierungsbzw. Äquilibrierungsschritte der einzelnen Säulen in den Trennsäuleneinheiten durch Steuerung der Pumpeinheiten (B, C, D), der Schaltung der Mehr-Wege-Ventile und der Fraktionssammler unter Verarbeitung der Signale der Detektoreinheiten (7 und 20, 21) über eine Rechneinheit erfolgt.

23. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekenn-

zeichnet, daß der Zugang der mobilen Phase zu jeder einzelnen Trennsäule der Trennsäuleneinheit (F) und zu jeder einzelnen Fraktioniersäule der Fraktioniersäuleneinheiten (E, G) separat rechnergesteuert über 4-Wege-Ventile durchgeführt wird. 5

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß nach Freispülung einer Fraktioniersäule der Fraktioniersäuleneinheit (G) in einen Fraktionssammler (31, 32, 33) der Fraktionssammelereinheit (H) mittels der Pumpeinheit (D) die Fraktioniersäule mit Wasser für die nächste Fraktionierung konditioniert wird (Roll-over-Betrieb). 10

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuführung des hochkomplexen Substanzgemisches zur Vorrichtung über eine Aufgabensäule erfolgt. 15

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das hochkomplexe Substanzgemisch mit einem Sorbent vermischt wird, in einem Lösungsmittel wie Methanol suspendiert, danach das Lösungsmittel abgetrennt und der mit dem komplexen Substanzgemisch beladene Sorbent in die Aufgabensäule gefüllt wird. 20

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennung des Substanzgemisches in der Trennsäuleneinheit (A) mit einem Gradient erfolgt, der eine zunehmende Lipophilie aufweist. 25

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß als Eluenten wäßrige Pufferlösungen und lipophilere Lösungsmittel eingesetzt werden. 30

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß als lipophilere Lösungsmittel Lösungsmittel wie Acetonitril, Methanol, Tetrahydrofuran und Isopropanol eingesetzt werden. 35

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß ein Peakerkennungsprogramm eingesetzt wird, das es erlaubt die Anzahl der Fraktionen zu optimieren. 40

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß in den Säulen der Fraktioniersäuleneinheit (E, G) entsprechend der Polarität der Fraktion unterschiedliche Sorbentien eingesetzt werden. 45

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Freispülung der Fraktioniersäulen im Backflush-Verfahren erfolgt. 50

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

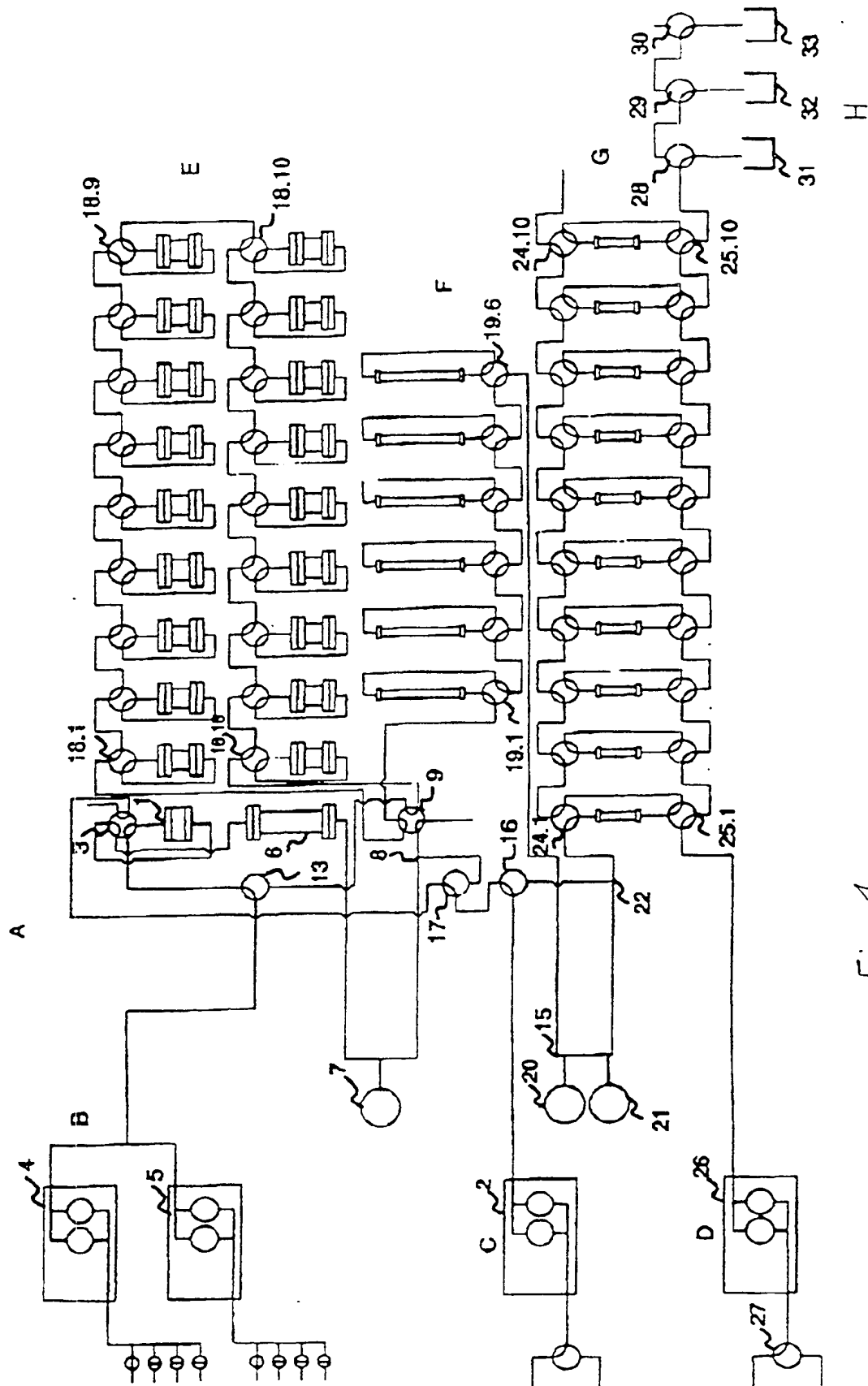


Fig. 1